

《短報》

多様なナス交雑系統の蒴培養および胚珠培養による倍加半数体系統の早期作成

上西愛子

Early generation of doubled haploid lines by anther culture and ovule culture of various eggplant hybrids

Aiko KAMINISHI

摘 要

多様な形質に着目した新規性のあるナス固定系統を早期に育成するため、F₂ 世代で完全ホモ接合個体を得られる倍加半数体(doubled haploid; DH)系統を作出した。当所で育成した水ナス品種‘サラダ紫’の親系統に、米ナス、イタリアンタイプ等、様々な特性を持つ市販 8 品種・系統を 13 通りの組み合わせで交配し、未熟果実から胚珠を採取し、培養することで世代促進を図った。それらの F₁ 系統の蕾 971 個から蒴 6,723 個を培養して、541 個体の半数体を得た。その DH₁ 系統を自殖して完熟種子を得ると共に、一部については胚珠培養により世代更新を促進させることで、親系統の播種から DH₂ 系統育成まで通常 3 年かかるところ、2 年に短縮できた。

キーワード：ナス，倍加半数体，胚珠培養

Summary

We have developed doubled haploid (DH) lines that can produce fully homozygous individuals in the F₂ generation to create novel fixed eggplant line with various traits. The parental lines of 'Sarada Murasaki' raised at our institute were used as a single parent in 14 crosses with commercial varieties with various characteristics, such as globe eggplant and Italian type etc. From 1,019 buds of the F₁ line, 7,040 anthers were cultured, resulting in 566 haploids. Furthermore, the generation renewal was promoted by cultivating embryos from immature fruits, and the time from the sowing of parental lines to the breeding of DH₂ lines was shortened to two years, instead of the usual three years.

Key words: doubled haploid, eggplant, ovule culture

緒 言

神奈川県内農産物の差別化による有利販売等を図るため、本県に特有の品種育成が求められている。その形質には‘とげなし’，‘果皮色の安定性’，そして‘生食用’など有用性が挙げられる。しかし交雑育種や F₁ 品種法では、交雑系統や親系統の形質を均一にするための固定化に年月を要するため、効率的で迅速な形質の固定化が課題となっている。自殖によって全染色体を固定化する場合、固定の速度は半数染色体数

(n) によって異なり、例えば $n=7$ のオオムギや $n=12$ のイネでは、それぞれ F₁₁ と F₁₂ 世代でゲノムの全遺伝子座中の 9 割が固定するとされている (Ukai 1987)。 $n=12$ のナスで同様の育成世代が必要と仮定すると、1 年 1 回の夏秋作で栽培して交配・選抜する場合、親系統を交配して雑種系統を作成してから自殖により遺伝的に固定する過程だけで 10 年以上の歳月が必要となる。

新たな形質を有する品種を育成するためには、F₁ 品

種の親として用いる系統の形質の固定化を早め、特性評価を行う方法を確立することが重要である。そこで本研究では、ナスの固定系統を早期に育成するため、多様なナスを用いて半数体系統の早期作成方法を検討した。この方法を確立することにより、F₁世代の配偶子から直接純系を得ることが可能となり、育種年限の大幅な短縮と新規形質を有する系統の評価が可能になる(加藤 2021)。ナスでは葯培養による倍加半数体育種法により‘土佐鷹’、‘慎太郎’、‘省太’、台木品種‘台二郎’等が育成されている(岡田ら 2002; 岡田ら 2007; 岡田ら 2010; 古賀ら 2013)。しかし、ナスは極めて多様な品種があり、遺伝的類縁関係が多様な品種を用いた交雑系統による倍加半数体系統の育成は充分検討されていない。また、ナスにおける成熟種子の採種には開花から約2ヶ月果実を樹上完熟させ、更に採取後数日間追熟が必要とされる(斉藤 2010)。本研究では多様なナス品種間を交雑し、その果実の完熟・追熟を待たず、未熟果実からF₁世代である胚珠を摘出して培養することで、更なる育成期間の短縮化についても検討した。

材料および方法

1. 供試材料

サラダ紫の親系統である「M06」及び「E5806」(当所育成系統; 北ら 2009)に、新規導入形質として外觀形質(とげなし性: 堀田ら 2003; 果皮色安定性: 松添ら 1999, 梅田ら 2006; 果形等: Phillips・Rix 1993, 吉

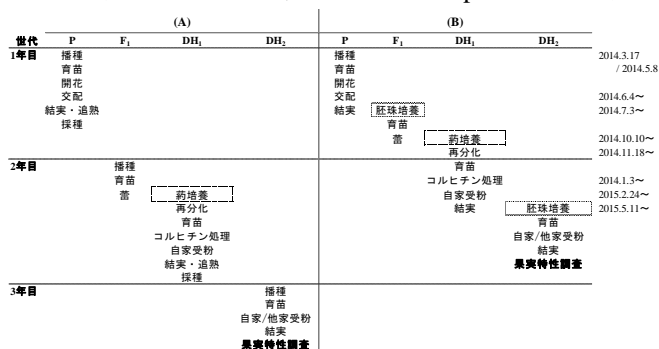


図1 ナス倍加半数体育成法の概要

年1回交配・採種する場合、倍加半数体系統の果実特性調査に至るまで3年かかる(A)。胚珠培養を組み合わせることにより、親系統交配から1年で倍加半数体自殖系統が得られ、2年で果実特性調査に至る(B)。

P:親系統, F₁:雑種第1世代, DH₁:倍加半数体第1世代, DH₂:倍加半数体第2世代

表1 花粉親品種の有用果実形質

タイプ	品種名	有用果実形質
千生り	とげなし紺美	とげなし、果形(長卵型)
水なすタイプ	SL紫水	とげなし、果実安定性、生食用
米ナス	Black Beauty	果皮色安定性(色むら防止)、へた色(緑色)、果形(丸型)、加工調理(洋食)用
イタリア丸ナス	Bellezza Nera Violetta Di New York	へた色(緑色)、果形(丸型)、加工調理(洋食)用
イタリア長ナス	De Barbentane Violetta Lunga 2	へた色(緑色)、果形(長型)、加工調理(洋食)用
ドワーフ	Pot Black F ₁	へた色(緑色)、果形(小型)、房成り、加工調理(洋食)用

田 2010) や調理用途(吉田 2000)が大きく異なる国内外の8品種(千生りナスタイプ「とげなし紺美 F₃」(当所保存系統)、水ナスタイプ‘SL紫水’(タキイ種苗(株))、米ナスタイプ‘Black Beauty’(Franchi Sementi S.p.A.)、イタリア丸ナスタイプ‘Bellezza Nera’(Johnsons Seeds Ltd.)、‘Violetta Di New York’(Hortus Sementi S.r.l.)、イタリア長なすタイプ‘De Barbentane’(Caillard; Société de Production Grainière SASU)、‘Violetta Lunga 2’(Hortus Sementi S.r.l.)、ドワーフタイプ‘Pot Black F₁’(Johnsons Seeds Ltd.)を交配系統として供試した(表1)。

2. 栽培条件

「M06」, 「E5806」, ‘SL紫水’, ‘Black Beauty’, 「とげなし紺美 F₃」(堀田ら 2003)は2014年3月17日、それ以外の品種は同年5月8日に播種した。「M06」を交配親とした組み合わせでは同年6月4日、「E5806」を用いた組み合わせでは同年6月24日から交配を開始した(図1)。交雑した果実の胚珠培養は同年7月3日から行い、発芽した個体はポット育苗後、同年10月24日に所内ガラス温室に定植し、最低夜温10℃で栽培した。F₁系統の葯培養は同年10月10日から行い、再分化した胚様体のホルモンフリー培地での培養は同年11月18日から、鉢上げは同年12月25日から開始した。染色体倍加のための0.1%コルヒチン(0.01% Tween20含有・3日間)処理は2015年1月3日から行った(岡田ら 2007)。得られた倍加半数体系統は閉鎖型苗生産システム(三菱ケミカルアグリ ドリーム株式会社)で育苗後、同年1月21日から順次所内ガラス温室で栽培した。DH系統自殖後代採種のための自家受粉は同年2月24日から開始し、完熟種子採種を行った。世代促進のため同年5月11日から胚珠培養を順次行った(図1)。

3. 胚珠培養条件

人工受粉後30日目の果実から中果皮と胎座を取り

表2 ナス蒴培養および胚珠培養による半数体および倍加半数体自殖系統作出数

交配組合せ	供試 蒴数	置床 蒴数	胚様 体数	再分化率 ^z (%)	半数 ^y 体数	倍加半数体 ^x 自殖系統数
E5806×SL紫水	50	335	58	17.3	51	14
E5806×とげなし紺美F ₃	42	300	128	42.7	33	17
E5806×Black Beauty	117	752	103	13.7	39	5
E5806×Violetta Lunga2	54	339	83	24.5	28	6
E5806×Pot Black F ₁	71	475	66	13.9	20	0
M06×SL紫水	74	525	186	35.4	101	42
M06×とげなし紺美F ₃	38	275	147	53.5	77	21
M06×Black Beauty	52	322	111	34.5	42	2
M06×Bellezza Nera	38	314	56	17.8	27	4
M06×Violetta Di New York	113	922	11	1.2	2	0
M06×De Barbentane	37	266	104	39.1	65	5
M06×Violetta Lunga2	48	320	101	31.6	55	6
M06×Pot Black F ₁	237	1,578	41	2.6	1	1
合計(平均)	971	6,723	1,195	17.8	541	123

^z再分化率=(胚様体数/置床蒴数)×100. ^y鉢上げした個体数. ^x倍加半数体第1世代から自殖完熟種子が得られた系統数.

出し表面を 70%エタノールで消毒後、次亜塩素酸ナトリウム液（有効塩素濃度 0.5% ; 0.01%Tween20）に 5 分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、無菌的に胚珠を摘出し、ホルモンフリーMS 培地（スクロース 30 g L⁻¹, 寒天 10 g L⁻¹, pH5.8）に置床し、25 °C, 16 時間明条件で培養した（Murashige・Skoog 1962）. 発芽後、ガラス容器内で本葉 2~3 枚期まで栽培後、順化し鉢上げした.

4. 蒴培養条件

外殖体として花粉母細胞が一核期後期と想定される「萼から花卉が全く見えない」もしくは「花卉と萼が同長」ステージの蒴を用いた（猿渡・飯牟禮 2008, 武田ら 1990）.

花蕾は前処理として暗黒下で 4 °C, 10 日間低温処理した（武田ら 1990）. その花蕾を 70%エタノールで消毒後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム液（0.01% Tween20）に 5 分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で 3 回洗浄した後、無菌的に蒴を取り出した. 蒴培養用 MS 培地（2,4-D 0.1 mg L⁻¹, カイネチン 0.1 mg L⁻¹, 活性炭 1 g L⁻¹, スクロース 30 g L⁻¹, 寒天 10 g L⁻¹, 硝酸銀 10 mg L⁻¹, pH5.8）に蒴を置床し、35 °C・暗条件・3 日間で培養した後、25 °C・16 時間明条件で培養した（岡田ら 2002, 古賀ら 2013）. 再分化した胚様体はホルモンフリーMS 培地（スクロース 30 g L⁻¹, 寒天 10 g L⁻¹, pH5.8）に置床し、引き続き 25°C・16 時間明条件で培養した.

結 果

新規導入形質として外観形質や調理用途が大きく異なる国内外の 8 品種・系統を花粉親に、当所保存 2 系統を種子親として交雑し、胚珠培養により世代促進を行い、その F₁ 系統の蒴を用いて、同一条件で蒴培養を行った（図 2 A, B）. その結果「M06」と 8 組み合わせ、「E5806」と 5 組み合わせの計 13 交雑組み合わせの F₁ 系統から蒴 971 個を採取、得られた蒴 6,723 個を培養したところ 1,195 個胚様体が再分化し、それらから半数体 541 個体が得られた（表 2 ; 図 2 C,D）. 蒴あたりの胚様体数の再分化率は 1.2 から 53.5%であった. 「E5806」, 「M06」両種子親とも千生りナスタイプの「とげなし紺美 F₃」との F₁ の胚様体再分化率は高かった（42.7 %および 53.5 %）が、他のタイプのナス

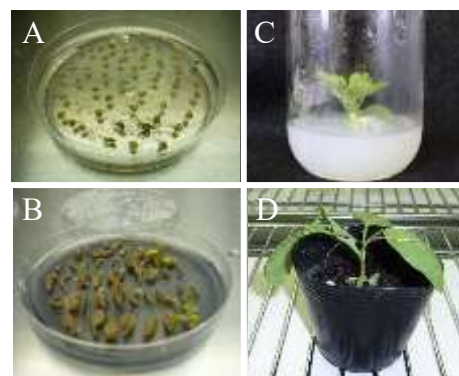


図 2 ナス胚珠培養と蒴培養

A: 胚珠からの発芽 B: 蒴から再分化した胚様体 C: 胚様体培養 D: 染色体倍加処理済の鉢上げ株

品種との交雑系統の再分化率は 1.2 から 39.1% だった (表 2) . それらに染色体倍加処理をし, 成長した主枝・側枝に自家受粉を行った結果, 123 系統から DH₂ 世代となる完熟種子が得られた (表 2) .

一連の操作で交配親系統播種 (2014 年 3 月 17 日, 5 月 8 日) から 1 年後の 5 月には DH₂ 世代の株を得ることができた. 年 1 回栽培・薬培養・採種する方法に胚珠培養を組み合わせることで, 通常 3 年必要とする固定系統育成過程を 1 年短縮し, 2 年でオリジナル固定系統を得ることができた.

考 察

本研究では, 遺伝的類縁関係が多様なナス品種を親系統とした固定系統を育成するため, 薬培養に加え, 胚珠培養を組み合わせることで育種期間の短縮を図った. 胚珠培養は受精後隔離による胚致死を回避する為に用いられる胚救済法の一つであるが, 本研究では未成熟種子の発芽に適用した (久保山 2021). その結果, 遺伝的類縁関係が多様な親系統の播種から 1 年間で DH₂ 世代となる完熟種子の生産や, DH₂ 育苗促進の為に胚珠培養が行うことができた. 有用遺伝的形質を持つ新規固定系統を育成する場合, 通常の交雑による育成では通常 10 年以上かかるところ, 今回用いた薬培養と胚珠培養を組み合わせる方法により世代促進され, 2 年間でオリジナル固定系統が作出できた.

しかしながら, 今回用いた薬培養条件では外国品種を片親にした F₁ 薬培養では, 胚様体再分化率が 1.2% と極度に低い交配組合せもあり, また倍加半数体自殖系統が育成できない組合せもあった. 同じ薬培養条件でも外植体とする品種・系統により再分化率が異なることは報告されている (岡田ら 1993; 古賀ら 2013). その一つの要因として, 薬培養において半数体に再分化できる花粉母細胞のステージは限定的であり, ナスと同じナス科に属するタバコでは第二減数分裂を経た四分子期細胞であり, ナスでは四分子期の後の小孢子分裂前の一核期の細胞であることが考えられる (中田・田中 1968 ; 武田ら 1990) . このステージの花粉母細胞を含む薬を得るため, 「萼から花弁が全く見えない」もしくは「花弁と萼が同長」という蕾の外観により判別している (猿渡・飯牟禮 2008, 武田ら 1990) . ま

た, 染色体倍加処理は細胞分裂時のコルヒチンの紡錘糸形成阻害によるが, これはコルヒチン処理中に生長点における体細胞分裂が 1 回生じるとの仮定による (鶴飼 2003) . 外国品種との雑種では日本ナスとは細胞増殖速度が異なるため, 今回の処理条件では染色体倍加が不十分だった可能性もある.

今回培養条件は同じでも外国品種との雑種で倍加半数体自殖系統育成率が低かったのは, 遺伝的背景が異なる雑種の薬における花粉母細胞成熟・蕾成熟ステージ・細胞増殖速度等が日本品種とは差異があると推察する. また, 半数体再分化率は, 薬の前処理・培地組成・培養温度などによっても大きく異なる (猿渡・飯牟禮 2008) ことから, 倍加半数体系統の作成にあたっては, 外植体の遺伝的バックグラウンドに合わせた交配組合せ・供試薬数・培養条件などを検討する必要があると考えられた.

以上のことから, 倍加半数体自殖系統育成率が高く倍加半数体自殖系統が数多く得られる場合は, 本研究で行った方法がナスの育種期間短縮に有効であり, 本研究で確立した技術はナス品種改良の育種年限を短縮するための有用なものとなることが期待される.

本研究を行う過程で, とげなしの形質を持つ 'SL 紫水' や「とげなし紺美 F₃」, 果皮色の安定性という形質を持つ 'Black Beauty', 生食が可能な形質を持つ素材の短期間での固定化により, 本研究で確立した技術により DH₂ 系統を早期に育成できる可能性を示すことができた. とげなし等の形質に着目し, 品種登録のための形質調査を行っていく予定であり, このような DH₂ 系統を活用した有用品種の育成の実現を期待したい.

引用文献

- 堀田行敏・菅原眞治・矢部和則.2003.ナスの栽培作業を不快にする特性と我が国の品種へのとげなし性の導入.園学研.2:1-4.
- 加藤謙司.2021.第9章 自殖性植物の育種法と半数体育種.p171-192.北柴大泰・西尾剛編.植物育種学 第5版.文永堂出版.東京.
- 北宜裕・北浦健生・曾我綾香・池上隆之.2009.ナス一代交雑品種 'サラダ紫' の育成. 神奈川農技セ研

- 報.151:1-7.
- 古賀武・下村克己・下吉孝行・三井寿一・浜地勇次・
齊藤猛雄・松永啓・齊藤新.2013.単為結果性ナス新
品種「省太」の育成.福岡農総試研報.32:52-58.
- 久保山勉.2021.第 6 章 交雑技術と種間交雑育種.p107-
128.北柴大泰・西尾剛編.植物育種学 第 5 版.文永
堂出版.東京.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for
rapid growth and bio assays with tobacco tissue
cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 中田和男・田中正雄.1968.葯の組織培養による花粉か
らのタバコ幼植物の分化.遺伝学雑誌.43:65-71.
- 岡田昌久・猪野亜矢・松本満夫.1993.米ナス葯培養によ
る植物体誘導.高知農技セ研報.2: 41-44.
- 岡田昌久・吉田健実・新田益男・松本満夫.2002.ナス台
木品種‘台二郎’の育成.高知農技セ研報.11: 53-61.
- 岡田昌久・松本満夫・和田敬・小松秀雄・高橋昭彦・
橋本和泉・新田益男.2007.促成栽培用ナス品種‘土
佐鷹’の育成.高知農技セ研報.16:39-44.
- 岡田昌久・橋本和泉・小松秀雄・松本満夫.2010.無加温
促成栽培用ナス品種‘慎太郎’の育成.高知農技セ
研報.19:25-28.
- Phillips, R. and M. Rix. 1993. Eggplant or Aubergine. p160-
163. VEGETABLES. Macmillan Publishers. London.
- 齊藤隆.2010.種子の発芽の生理, 生態.p 基 33-基 42.農
業技術大系 野菜編 第 5 卷 ナス.農山漁村文化協
会.東京.
- 猿渡真・飯牟禮和彦.2008.ナス葯培養における効率的
な胚様体作出法.熊本農研セ研報.15:23-27.
- 武田恭明・三輪龍志・浅平端.1990.ナス葯培養における
胚様体形成の促進.園学雑.59 別 1:244.
- Ukai, Y. 1987. Fixation of genes and breakup of linkage
blocks in selfed generations. *Japan. J. Breed.* 37: 40-53.
- 鶴飼保雄.2003.第 9 章染色体変異と倍数性育種.p222-
270.植物育種学 交雑から遺伝子組換えまで.東京
大学出版会.東京.
- 梅田知季・宮崎肇・山本愛・彌富道男・山口雅篤・松
添直隆.2006.ナスの果皮組織にみられるアントシ
アニン組織と光環境との関係.植環工.18:193-199.
- 吉田建実.2000.海外のナス生産.p 基 159- p 基 161.農業
技術大系 野菜編 第 5 卷 ナス.農山漁村文化協会.
東京.
- 吉田建実.2010.原産と来歴.p 基 3- p 基 7.農業技術大系
野菜編 第 5 卷 ナス.農山漁村文化協会.東京.

